

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
Імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

**РАДЧЕНКО ЛАРИСА ВАСИЛІВНА**

УДК: 578.74+575.22+578.832.1

**АНТИГЕННА ТА ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ  
ГРИПУ ЛЮДЕЙ В УКРАЇНІ У 2012-2015 РОКАХ**

03.00.06 – вірусологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на базі відділу респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України».

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, старший науковий співробітник

**Міроненко Алла Петрівна,**  
ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України»,  
завідувач відділу респіраторних та інших вірусних інфекцій

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

**Щербатенко Іван Степанович,**  
Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
старший науковий співробітник відділу вірусів

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

**Рибальська Алла Петрівна,**  
ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»,  
завідувач лабораторії мікробіології та проблем антиінфекційного імунітету

Захист дисертації відбудеться 11 квітня 2017 р. о 14.00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.14 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 03127, м. Київ, проспект академіка Глушкова 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58.

Автореферат розісланий « 7 » березня 2017 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

В.В. Джаган

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми дослідження.** Незважаючи на значні наукові здобутки останніх десятиліть, грип залишається серйозною проблемою для всього світу та є найбільш розповсюдженою інфекційною хворобою. Щорічні епідемії грипу призводять до значної кількості захворювань та смертності у світі. Віруси грипу типу А здатні викликати пандемію, що призводить до втрати мільйонів життів. (Paul J. et al., 2010).

Здатність вірусу грипу до антигенної та генетичної мінливості за рахунок різних механізмів – точкових мутацій, рекомбінацій та реасортацій, змушує вчених проводити постійний моніторинг циркуляції вірусів. (Міроненко, Голубка, 2016). Високі темпи зміни поколінь вірусів, одночасна циркуляція вірусів грипу людини і тварин визначають швидкість еволюційних процесів. Все це уможливорює формування вірусу з новими антигенними і біологічними властивостями, тобто полегшує адаптацію вірусу до змін у навколишньому середовищі. Мінливість антигенних і біологічних властивостей є фундаментальною особливістю вірусів типу А (Дзюблик, 2005). Аналіз антигенної мінливості вірусу грипу становить важливу задачу, оскільки саме він дозволяє відслідковувати антигенний дрейф вірусів і вчасно вносити зміни до складу грипозних вакцин (Nelson et al., 2007). Молекулярні методи дослідження, зокрема генетичний аналіз – метод сиквенування, дозволяють спостерігати за змінами у вірусах грипу на генетичному рівні. Саме генетичний аналіз дозволяє не лише визначити спорідненість вірусів грипу до відомих штамів, а й уможливорює порівняння всіх досліджуваних ізолятів між собою, даючи повну генетичну картину тієї чи іншої популяції вірусів грипу.

Порівняння властивостей нових штамів вірусів з вже охарактеризованими референс-вірусами минулих років дозволяє робити прогнози відносно можливої вірулентності цих збудників, про патогенез інфекції, викликані такими вірусами, а також дозволяє прогнозувати появу змінених епідемічних та пандемічних штамів (Nelson et al., 2007). Саме це наразі стало пріоритетним напрямком дослідження вірусів грипу людей на молекулярному рівні.

Вивчення молекулярно-генетичних характеристик штамів вірусів А і В, що циркулюють в Україні, є одним з основних ланцюгів системи моніторингу еволюційних змін вірусів на території нашої країни за певний період.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалась у межах науково-дослідної роботи, виконаної у відділі респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» у рамках науково-дослідних робіт «Філогенетичний аналіз вірусів грипу та напрямок їх еволюції» (№ держреєстрації: 0111U002013) - 2011-2013 роках. та «Розробити програму етіологічного прогнозування епідемій грипу в Україні» (№ держреєстрації: 0114U000383) - 2014-2016 роках.

**Мета та завдання дослідження.** Аналіз мінливості вірусів грипу за антигенними і генетичними характеристиками та на основі філогенетичного порівняння (з 2012 по 2015 роки).

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- 1) Виділити та накопичити в культурі клітин віруси грипу в епідемічних сезонах 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015 років.
- 2) Встановити антигенну подібність виділених вірусів грипу до референс-штамів, визначених Світовими центрами грипу.
- 3) Проаналізувати генетичне різноманіття вірусів грипу, ізольованих в Україні з 2012 по 2015 роки.
- 4) Провести посезонний філогенетичний аналіз вірусів грипу, циркулюючих в Україні, для визначення їх генетичної спорідненості з такими, що циркулюють в світі.
- 5) Проаналізувати наявні мутації у генах HA і NA вірусів грипу, виділених в Україні у 2012-2015 роках за базою даних GISAID.

**Об'єкт дослідження** — генетична і антигенна мінливість вірусів грипу А та В, що циркулюють в Україні.

**Предмет дослідження** — віруси грипу типів А і В, антигенні та генетичні характеристики вірусів грипу.

**Методи дослідження.** Вірусологічні, молекулярно-генетичні, філогенетичні, статистичні.

#### **Наукова новизна одержаних результатів.**

**Вперше** на основі побудови унікальних філогенетичних дерев з використанням методу об'єднання найближчих сусідів (NJ) встановлена генетична подібність досліджуваних ізолятів 2012-2015 років до вірусів грипу, виділених в інших країнах в цей час та до вакцинних штамів.

**Вперше** проведено антигенний аналіз актуальних вірусів грипу людей, що циркулювали в країні у 2012-2015 роках, та визначено їх ступінь подібності до референс - та вакцинних штамів.

**Вперше** на основі аналізу амінокислотних послідовностей генів HA і NA вірусів грипу 2012-2015 років, виявлені унікальні амінокислотні заміщення, притаманні лише вірусам грипу, що циркулювали в Україні та виявлені мутації, які відрізняли ці віруси від таких, що циркулювали в світі.

**Вперше** в Україні проведений посезонний **порівняльний** аналіз амінокислотних заміщень вірусів грипу людей типу А: А(Н3N2), А(Н1N1)pdm09 та типу В генетичної гілки — В/Yamagata, що циркулювали в Україні та в інших країнах в цей період, і це дозволило виявити різноманіття циркулюючих збудників грипу, які належали до різних генетичних кластерів протягом періоду спостереження.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати впроваджено у роботу Національного Центру грипу в Україні, який є важливою складовою ланкою нагляду за грипом у світі щороку. Філогенетичний аналіз був застосований для вдосконалення дослідження генетичної мінливості збудників грипу в країні, що допомогло проводити етіологічне прогнозування епідемій грипу в країні, а саме – появу нових епідемічних штамів та визначення домінуючого збудника кожної епідемії на рівні штаму та генетичної групи.

Результати роботи щороку використовувались Національним центром грипу для укладання етіологічного прогнозу наступної епідемії та впроваджувались в роботу МОЗ та ДСЕС України для прийняття рішень.

Генетичний аналіз виділених в Україні вірусів був застосований також як інструмент контролю якості роботи вірусологічних лабораторій.

За даними результатами виконаної роботи підготовлено до друку один інформаційний лист для медичних працівників та населення.

З сезону 2014-2015 року застосовується та рекомендується для впровадження у практику ізоляція вірусів грипу на культурі клітин MDCK-SIAT замість MDCK, як більш чутлива модель, а також для запобігання виникнення великої кількості синонімичних мутацій в вірусах при культивуванні.

Направлення українських штамів вірусів грипу до світових центрів грипу (CDC, Атланта, США та Лондон, Великобританія) з наступним їх детальним вивченням і порівнянням зі штамми з інших країн, дало змогу враховувати одержану інформацію при відборі штамів вірусу грипу для формування рекомендацій щодо складу вакцин до наступного епідемічного сезону.

Результати роботи були впроваджені у педагогічний процес на кафедрі вірусології НМАПО ім. П.Л.Шупика.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною роботою автора. Ідея роботи, мета і завдання досліджень сформульовано автором особисто. Опрацювання літературних джерел, інформаційний пошук, розробка схеми експерименту та її реалізація, отримання експериментальних даних, їх узагальнення та інтерпретація здійснена автором особисто під керівництвом д. мед. н. А.П. Міроненко.

Лабораторні дослідження первинних зразків методом real-time RT-PCR, виділення вірусів грипу на культурі клітин MDCK та MDCK-SIAT, проведення штамової ідентифікації виділених ізолятів вірусів грипу проводились у відділі респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» разом з науковими співробітниками відділу.

Філогенетичний та антигенний аналіз вірусів грипу A(H3N2), A(H1N1pdm)09, В/Уаmagata, виділених в Україні з 2012 по 2015 роки проведений автором особисто у відділі респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» .

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на науково – практичній конференції «Інфекційні хвороби: невирішені проблеми (діагностика, етіопатогенетичні особливості, лікування, профілактика)» (Київ, 2013); VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Москва, 2014); 4<sup>th</sup> International Influenza Meeting (Muenster, September 21-23, 2014); конференції в рамках VI Міжнародного медичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України» (Київ, 2015); науково-практичній конференції «Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека», присвяченої щорічним «Читанням» пам'яті академіка Л.В.Громашевського (Київ, 2015).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць, з них 11 наукових статей у фахових наукових виданнях (4 мають індекс цитування), 2 – у закордонному виданні та 9 тез наукових конференцій (4 – за кордоном).

**Структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 162 сторінках і складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 4 розділи власних досліджень та їх обговорення, узагальнення отриманих результатів, висновків. Список літератури включає 153 джерела. Дисертація ілюстрована 30 рисунками та 20 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури** складається з семи підрозділів, де наведено останні відомості про вірусів грипу, їх антигенну та генетичну характеристику. Приділено увагу важливому питанню щодо досліджень мінливості вірусів грипу, порівняльній характеристиці мутацій в ізолятах, виділених на території України та в світі протягом досліджуваних сезонів. Огляд літератури обґрунтовує доцільність виконання роботи для поглибленого моніторингу вірусів грипу в Україні.

**Матеріали та методи дослідження.** Для досліджень використовували зразки від хворих на грипоподібні захворювання (ГПЗ) та тяжкі гострі респіраторні захворювання (ТГРЗ): мазок із носу, носоглотки або ротоглотки, та ізоляти вірусів грипу з чотирьох дозорних центрів (міста Київ, Одеса, Дніпропетровськ та Хмельницький) та інших міст (18 лікувально-профілактичних закладів, з них 10 стаціонарів та 8 поліклінік, в тому числі педіатричних), відібрані в період з 2012 по 2015 роки.

Виділення та накопичення вірусів грипу проводили на чутливій культурі клітин (КК) MDCK. Також, ізоляти, позитивні в ПЛР на грип виділяли на генетично-модифікованій культурі клітин MDCK-SIAT, одержаній з Світового центру грипу (Атланта).

Нуклеїнову кислоту (РНК) виділяли з використанням комерційного набору Instant Virus RNA Kit (Analytik Jena). Приготування реакційної суміші проводили із застосуванням набору AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Ambion) та набору праймерів і зондів з двома мітками (Taqman) на цільові гени, надісланих Центром по контролю за інфекціями (CDC, Атланта, США). Позитивні контролю, що використовували в дослідженні: на сезонний (А, В, Н1, Н3), пандемічний (A/pdm, H1pdm09), пташиний (H5) та РНК клітинного походження (RP) були отримані разом із праймерами і зондами (CDC, Атланта, США).

Для проведення ампліфікації використовували прилад 96-лункового формату ПЛР в реальному часі Applied Biosystems™ real-time PCR 7500.

Антигенну подібність виділених ізолятів протягом досліджуваних сезонів визначали в реакції гальмування гемаглютинації (РГГА) з використанням референс-штамів вірусів грипу: A/California/07/2009, A/Washington/24/2012, A/Victoria/361/2011, A/Texas/50/2012, B/Wisconsin/01/2010, B/Massachusetts/02/2012, A/California/02/2014, B/Brisbane/36/2012, A/Massachusetts/015/2013,

B/Phuket/3073/2013, B/HongKong/3417/2014, A/Switzerland/9715293/2013, A/Stockholm/6/2014, A/HongKong/5659/2012, A/South Africa/3626/2913.

Вірусологічні дослідження проводились на базі відділу респіраторних та інших вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського НАМН України». Їх обсяг наведено в таблиці 1.

Таблиця 1.

## Обсяг проведених досліджень

№ п/п	Об'єкт/предмет вивчення	К-ть досліджень	
		Всього	У т.ч. власні
1.	Досліджено зразків методом real-time RT-PCR	1341	1341
2.	Ідентифіковано вірусів грипу на рівні типу та підтипу методом real-time RT-PCR	463	463
3.	Виділено вірусів грипу на культурі клітин MDCK та MDCK- SIAT,	671	259
4.	Ідентифіковано вірусів грипу на рівні штаму методом РГГА	152	152
5.	Проведено генетичний аналіз послідовностей сиквенованих вірусів грипу	49	49
6.	Побудовано філогенетичні дерева методом NJ	18	18

Сиквенування виділених вірусів грипу проводили у Світових центрах грипу в Лондоні (CDC) та Атланті (USA) в рамках Глобальної програми нагляду за грипом. Сиквенси надіслані нам у форматі Fasta та розміщені з обмеженим доступом на ресурсі GISAID (<http://platform.gisaid.org/>), присвяченому вірусам грипу. Пошук та вибірку необхідних послідовностей проводили за допомогою BLAST (BasicLocal Aligment Search Tool) аналізу (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Вирівнювання послідовностей проводили із застосуванням алгоритму ClustalW. Філогенетичні дерева будували у програмі MEGA 6.0. Для аналізу подібності досліджуваних послідовностей філогенетичні дерева будували методом дистанційним Neighbor-Joining (об'єднування найближчих сусідів), із застосуванням моделі Кімури (Kimura 2-parameter). Для статистичної оцінки значущості отриманих результатів застосовували метод бутстреп-аналізу (Bootstrap) з числом реплікацій 1000-100. Оцінку достовірності отриманих результатів здійснювали за t-критерієм Ст'юдента. Крім цих методів було використано можливості програмного забезпечення Microsoft Excel та MEGA 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Виділення, типування та штамова характеристика вірусів грипу, що циркулювали в Україні з 2012 по 2015 роки.** На першому етапі роботи протягом трьох епідемічних сезонів на культурах клітин MDCK та MDCK-SIAT нами було

виділено 671 польових ізолятів вірусів грипу, з яких у сезоні 2012-2013 років — 232 ізоляти; в 2013-2014 років — 168; в 2014-2015 років — 271 ізолят.

Типування та субтипуювання циркулюючих ізолятів проводили методом real-time RT-PCR. Всього методом ЗТ-ПЛР в реальному часі було опрацьовано 1341 зразок: в сезоні 2012-2013 років — 654; в 2013-2014 років – 462; і в 2014-2015 років – 225.

Сезон 2012-2013 років характеризувався сумісною циркуляцією трьох різних вірусів: A/Victoria/361/2011(H3N2), A/California/1/2009 (A(H1N1)pdm09 та B/Wisconsin/01/2010 (генетичної гілки B/Yamagata). Кожен з цих вірусів не був новим для нашої країни, що і зумовило низький рівень інтенсивності епідемічного процесу в цьому сезоні. Провідним збудником цього сезону були віруси підтипу A(H1N1)pdm09 – 106 ізолятів, що склали (45,6±3,3) % від загального числа виділених вірусів (рис. 1). Другорядними збудниками епідемії були віруси грипу типу В – 66 ізолятів (28,6±2,9) % і віруси грипу підтипу A(H3N2) – 60 (25,8±2,8) %. Результати антигенної характеристики вірусів A(H1N1)pdm09, виділених в Україні в сезоні 2012-2013 років, показали, що вони мали найбільшу спорідненість до референс-штаму A/California/07/2009.



Рис. 1. Структура популяції вірусів грипу в 2012-2015 роках в Україні.

У світі спостерігалась відмінна від України епідемічна ситуація (рис. 2). Домінуючим збудником були віруси грипу A(H3N2) – (31,1±3)% . Другорядну роль грали віруси грипу типу В двох генетичних гілок – B/Victoria та B/Yamagata і пандемічні віруси грипу.

Епідемічний сезон грипу 2013 - 2014 років був низької інтенсивності з переважанням в ньому збудника A/Texas/50/2012 (H3N2). В сезоні 2013-14-го активність вірусу грипу типу В була найменшою за останні 5 сезонів (рис.1).

Протягом епідемічного сезону 2013 - 2014 років було досліджено 356 клінічних зразків від хворих на грип, серед них було виявлено 155 вірусів грипу типу А: A(H1N1)pdm09 – 7 ізолятів (4,2±1,5)%, A(H3N2) – 123 ізоляти (73,3±3,4)%, А неідентифікований – 25 ізолятів (14,8±2,7)% та вірусів грипу типу В – 13 ізолятів (7,7±2,0)%. Домінуючими в світі цього сезону були віруси грипу A(H1N1)pdm09, їх відсоток складав (43,4±3,2) % (рис. 2).

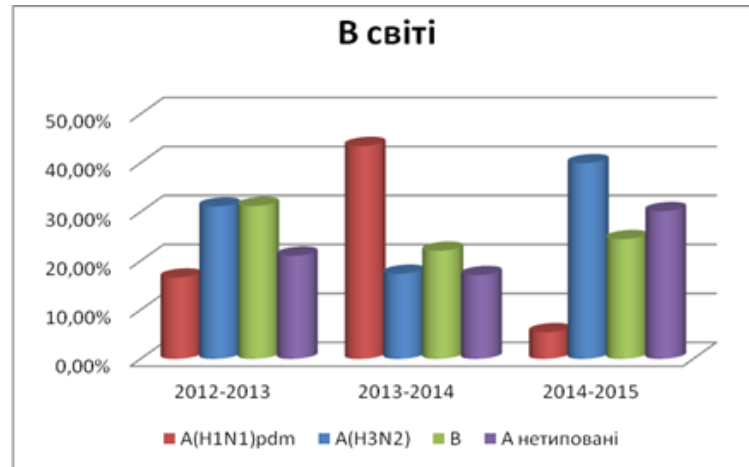


Рис. 2. Структура популяції вірусів грипу в 2012-2015 роках в світі.

За результатами антигенного аналізу провідного збудника сезону 2013-2014 років віруси грипу A(H3N2) мали найбільшу спорідненість до референс-штаму A/Texas/50/2012.

За даними ВООЗ в світі у сезоні 2014-2015 років переважали віруси грипу типу A(H3N2) ( $39,9 \pm 2,8$  %), тоді як віруси грипу типу B зустрічались в меншій кількості ( $24,4 \pm 2,5$  %) (рис. 2).

Провідним збудником сезону були віруси грипу типу B, генетичної гілки B/Yamagata, відсоткова частка яких становила ( $64,2 \pm 2,9$ )%. Другорядними збудниками були віруси грипу A(H1N1)pdm09 – ( $15,3 \pm 2,1$ )% та A(H3N2) – ( $7,3 \pm 1,6$ )%. За результатами антигенного аналізу віруси грипу B мали найбільшу спорідненість до референс-штаму B/Phuket/3073/2013.

Таким чином, три досліджувані сезони (2012-2015 років) в Україні були різними за інтенсивністю епідемічного процесу та провідним збудником. Відмінності у вірусах, виявлені в РГГА при взаємодіях з сироватками, свідчать про поступову зміну антигенних властивостей пандемічних вірусів. Лише вакцинний штам A/California/07/2009 (H1N1) був незмінним протягом трьох досліджуваних сезонів і включений в склад вакцин на наступний 2015-2016 сезон. Віруси грипу A(H3N2) та B ілюстрували гетерогенність антигенних властивостей гемаглютиніну ізолятів, що циркулювали, в результаті чого змінювалась спорідненість до різних штамоспецифічних сироваток та щосезонно був зміненим склад вакцин.

**Філогенетичний аналіз вірусів грипу А, циркулюючих в Україні з 2012 по 2015 роки.** Віруси грипу типу А (A(H3N2) та A(H1N1)pdm09) виділялися в усіх трьох досліджуваних епідемічних сезонах.

Сезонні віруси грипу A(H1N1) в Україні після 2008 року не виділялися. З 2010 року в світі не зареєстровано випадків виявлення чи виділення вірусів сезонного грипу і невідомо, чи зберігся цей вірус в людській популяції, чи був витіснений A(H1N1)pdm09.

**Генетична характеристика вірусів грипу A(H1N1)pdm09.** В сезоні 2012-2013 років пандемічні віруси були домінуючими. Результатом філогенетичного аналізу є дендрограма, подана на рис. 3, на якій показано, що протягом епідемічного сезону 2012-2013 років в Україні циркулювали різні варіанти пандемічних вірусів грипу,

які, однак, зберегли подібність до вакцинного штаму на досить високому рівні — 97%.

Українські ізоляти розташувались у трьох генетичних групах:

**1 Група**—A/St.Peterburg/100/2011-подібні. Характеризувались амінокислотними заміщеннями S143G і A197T

**2 Група** — A/Hong Kong/5659/2012-подібні. Це ізоляти із заміщеннями H138R і V249L. (рис.3).

**3 Група** — A/St.Peterburg/27/2011-подібні. У всіх вірусів групи, окрім референс-штаму були виявлені заміщення K283E і E499K, а окрім ізоляту з Бразилії — V234I.

Мінливість гену нейрамінідази була менш інтенсивною за таку у гемаглютиніну. Так, українські ізоляти розташувались у двох генетичних групах. Без змін залишилася група A/Hong Kong/5659/2012-подібних вірусів, в якій розташувалися виділені нами ізоляти A/Ukraine/3/13 і A/Ukraine/523/13. А інші 8 вірусів за нейрамінідазою були подібні до референс-штаму A/St.Peterburg/100/2011.

За результатами філогенетичного аналізу генів гемаглютиніну було виявлено, що всі ізоляти, виділені в різних країнах світу в сезоні 2013 - 2014 років підтипу A(H1N1)pdm09, були генетично подібними до референс-штаму A/South Africa/3626/2013, а також зберегли подібність до вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1) на рівні 96%. Віруси показали заміщення K283E і E499K, а частина з них також K163Q і A256T. Щодо досліджуваного штаму A/Ukraine/28/2014, то у нього було виявлено унікальне заміщення I510V, а також разом зі штамом A/Lisboa/4/2014 - заміщення T474M.

Віруси сезону 2014-2015 років показали заміщення E499K, K283E і K163Q, а частина з них також V321I і A256T, які були виявлені частково й у вірусів сезонів 2012-2013 та 2013-2014 років. Щодо досліджуваних українських штамів, то лише два з них мали заміщення: A/Dnipro /454/2015 – у якого було виявлено унікальне заміщення D94N (аспарагінова кислота замінювалася на аспарагін) та ізолят A/Ukraine/433/2015, де спостерігалось заміщення аргініну лізином в 205 положенні (R205K), а також з ізолятом A/Berlin/81/2014 - заміщення S84N (серин заміщувався на аспарагін).

Таким чином, мінливість пандемічних вірусів грипу у сезоні 2014-2015 залишилась на низькому рівні, як і в попередніх 2012-2013 та 2013-2014 роках. Часті реверсії свідчать про не вичерпаний інфекційний потенціал «старих штамів». Низький рівень мутаційних змін в ізолятах поточної епідемії зберігає високу подібність пандемічних вірусів грипу до вакцинного штаму A/California/07/2009(H1N1), який залишився незмінним і його включено до складу вакцин на наступний епідемічний сезон 2015-2016 років.

Отже, філогенетичне порівняння циркулюючих в Україні у 2012-2015 роках вірусів грипу A(H1N1)pdm09 засвідчило їх несуттєві зміни за цей період спостереження.

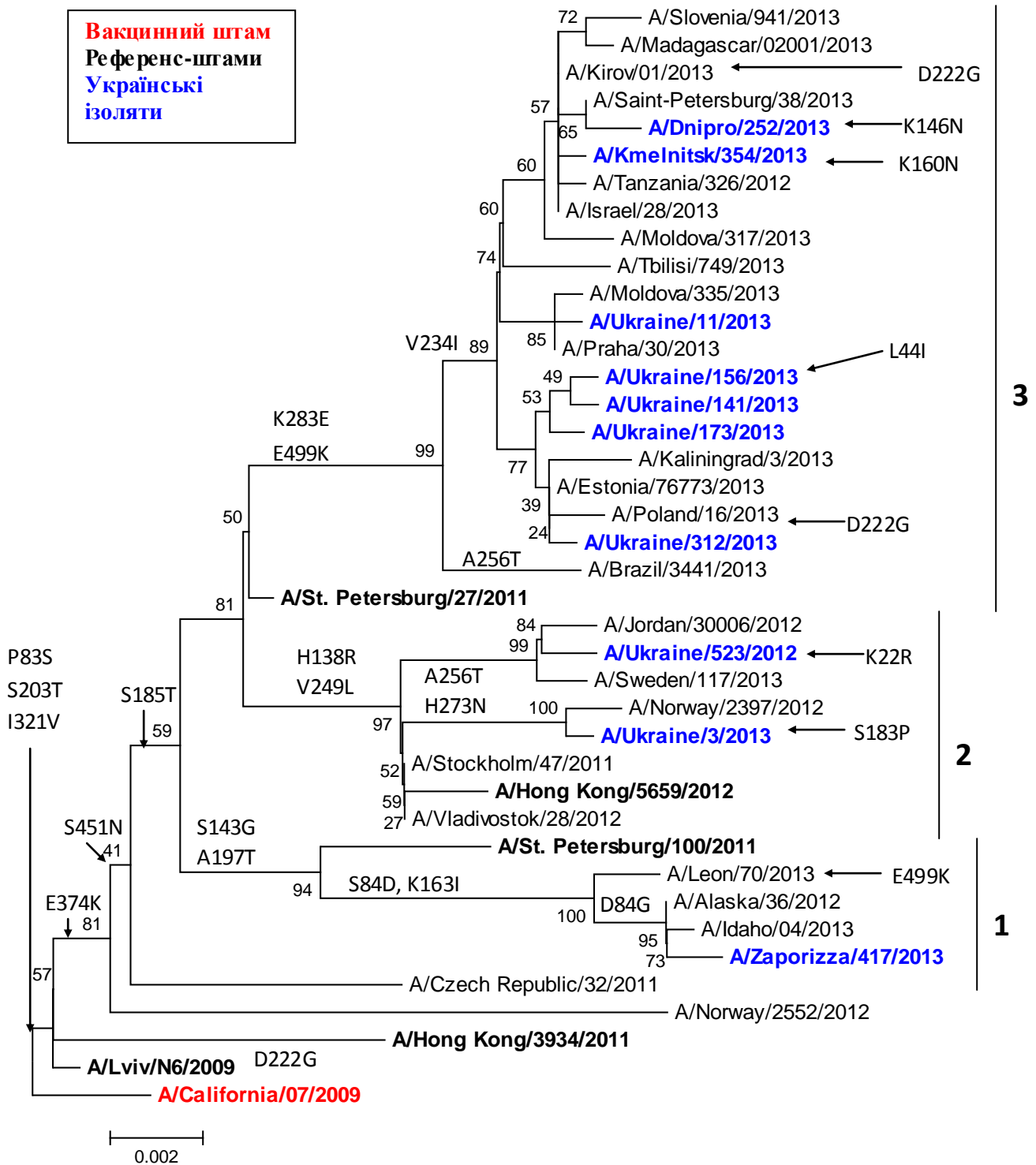


Рис. 3. Філогенетичне дерево вірусів грипу А(Н1N1)pdм09 сезону 2012-2013 за нуклеотидними послідовностями НА, проведений методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Щодо досліджуваних українських штамів, то лише два з них мали заміщення: A/Dnipro /454/2015 – у якого було виявлено унікальне заміщення D94N та ізолят A/Ukraine/433/2015, де спостерігалось заміщення аргініну лізином в 205 положенні (R205K).

**Генетична характеристика вірусів грипу А(Н3N2).** Філогенетичне дерево, побудоване методом об'єднання найближчих сусідів показало подібність виділених в умовах дозорного епіднагляду ізолятів до вакцинного штаму A/Victoria/361/2011 і розташування у субкластері 3С кластеру Victoria/208 (рис. 4).

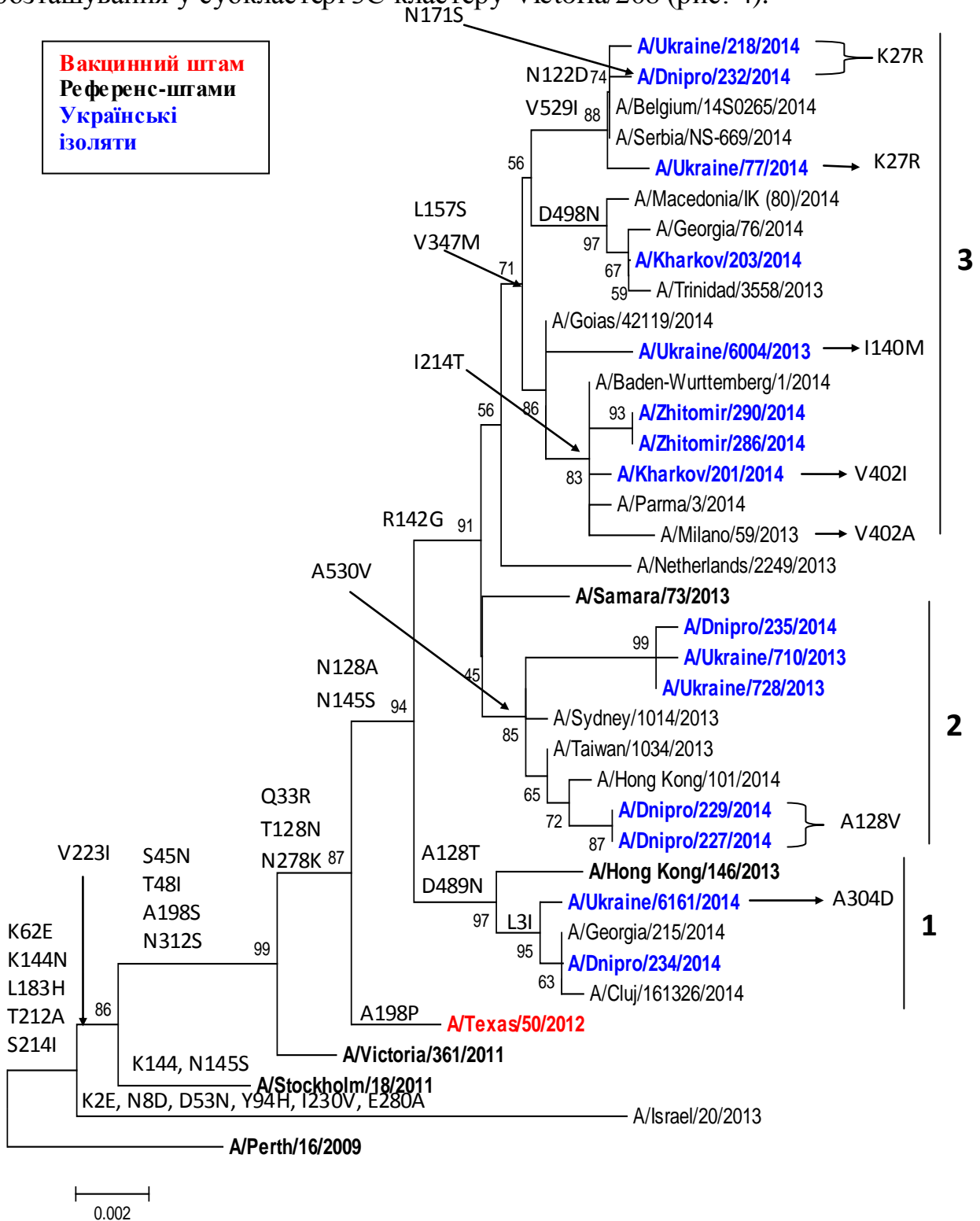


Рис. 4. Філогенетичне дерево вірусів грипу А(Н3N2) сезону 2013-2014 за нуклеотидними послідовностями гемаглютиніну (НА), проведений методом NJ, модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

У сезоні 2013 – 2014 років віруси грипу А(Н3N2) домінували в Україні. Всі досліджувані ізоляти сезону 2013 - 2014 років, як і в минулому епідсезоні, розташувались у субкластері 3С кластеру А/Victoria/208/2009 разом з вакцинним штамом А/Texas/50/2012. Вони набули нових амінокислотних змін, які дозволили виділити їх у три групи разом з ізолятами з Мілану, Македонії, Бельгії, Нідерландів, Грузії, Сіднея.

**1 - а група** – віруси з заміщенням А128Т і D489N. Група об'єднала ізоляти 2014 року і референс-штам А/Hong Kong/146/2013. Причому, минулорічні штами набули також заміщення L3I. До групи увійшли українські ізоляти А/Dnipro/234/2014 і А/Ukraine/6161/2014.

**2 - а група** – об'єднала ізоляти 2013 - 2014 років, які несли заміщення А530V. Сюди увійшли ізоляти з Дніпропетровська (А/Dnipro/227/2014, А/Dnipro/229/2014, А/Dnipro/235/2014) та Києва (А/Ukraine/710/2013, А/Ukraine/728/2013).

**3 – я група** – об'єднала ізоляти з мутаціями L157S і V347M, причому, остання була виявлена раніше у наших ізолятів сезону 2012 – 2013 років. Група містила, як віруси з різних регіонів України, так і штами з різних куточків світу. Ізоляти А/Zhitomir/286/2014, А/Zhitomir/290/2014 і А/Kharkov/201/2014 набули заміщення I214T.

Усі досліджувані ізоляти сезону 2014-2015 років, як і в минулому епідсезоні, розташувались у субкластері 3С кластеру А/Victoria/208/2009 разом з вакцинним штамом А/Texas/50/2012. Однак вони набули нових амінокислотних змін, які дозволили виділити їх у три групи - 3С.2а, 3С.3а, 3С.3б. Більшість українських ізолятів належали до групи 3С.2а, представники якої характеризуються нездатністю зв'язувати еритроцити морської свинки. Вакцинний штам А/Texas/50/2012 разом з ізолятами двох останніх сезонів селектував заміщення Q33R і N278K.

Українські ізоляти А/Ukraine/165/2015 і А/Khmelnytsky/467/2015 разом з ізолятами з Австрії, Англії та Фінляндії набули заміщення K83R, Q197H. Разом з ізолятом з Мадриду (А/Madrid/15053/2014) ці ізоляти мали мутації E62K та V347K. Унікальне заміщення R261Q набув ізолят А/Ukraine/165/2015 та ізолят А/England/533/2014. До групи увійшли також українські ізоляти – А/Khmelnytsky/469/2015, А/Khmelnytsky/465/2015, А/Khmelnytsky/468/2015, А/Khmelnytsky/466/2015 та А/Ukraine/501/2014, останній з яких показав заміщення Q75H.

За результатом філогенетичного аналізу генів нейрамінідази встановлено, що незначна частина досліджуваних ізолятів сезону 2014-2015 років з інших країн були генетично подібними до вакцинного штаму А/Texas/50/2012, але вони характеризувались спільним заміщенням D93G, яке спостерігалось і в ізолятах сезону 2012-2013 і 2013-2014 років.

Отже, філогенетичне порівняння циркулюючих в Україні у 2012-2015 років вірусів грипу засвідчило значні дрейфові зміни у популяції вірусів підтипу А(Н3N2).

**Філогенетичний аналіз вірусів грипу В, циркулюючих в Україні з 2012 по 2015 роки.** Віруси грипу типу В виділялись в досліджуваних епідемічних сезонах з 2012 по 2015 роки. На території України циркуляція вірусів генетичної лінії В/Victoria, починаючи з сезону 2012-2013 рр., не спостерігалася, циркулювали лише

віруси лінії В/Yamagata. Генетичний аналіз проводили по сегментах гемаглютиніну (НА) та нейрамінідази (НА).

**Генетична характеристика вірусів грипу типу В генетичної гілки В/Yamagata.** У сезоні 2012-2013 років ізоляти грипу В/ Yamagata розділились на два генетичні кластери: В/Wisconsin/01/2010 і В/Massachusetts/02/2012-подібні, які відповідають двом вакцинним штамам. Усі ізоляти кластеру В/Wisconsin/01/2010 несли заміщення S150I і N165Y у гені гемаглютиніну. Тут розташувалась половина виділених нами ізолятів у 2012 - 2013 роках переважно з Києва та Хмельницького. Кластер В/Massachusetts/02/2012 є новим відгалуженням, яке бере початок у 2012 році і є еволюційним продовженням В/Brisbane/3/2007-подібних вірусів, які селектували заміщення R48K і P108A.

Аналіз за генами нейрамінідази повністю корелював з аналізом за генами гемаглютиніну.

У сезоні 2013-2014 років для філогенетичного аналізу були взяті послідовності генів гемаглютиніну та нейрамінідази єдиного сиквенованого ізоляту, виділеного в Україні В/Dnipro/177/2014. Досліджуваний ізолят розташувався в межах кластеру В/Wisconsin/01/2010. Загалом ізоляти вірусів грипу В/Yamagata, виділені в інших країнах в сезоні 2013 – 2014 років знаходились у двох генетичних кластерах. Варто зазначити, що для поточного сезону вакцинним штамом був обраний В/Massachusetts/02/2012, тоді як В/Wisconsin/01/2010 — для минулих сезонів. Група, до якої увійшов наш ізолят В/Dnipro/177/2014, показала заміщення M251V.

Віруси грипу типу В генетичної гілки В/Yamagata домінували в Україні в сезоні 2014-2015 років. Результати філогенетичного аналізу, представлені на рисунку 5, показали, що досліджувані українські ізоляти знаходяться в межах кластеру В/Wisconsin/01/2010 (рис.5).

Більшість ізолятів поточного сезону виявили подібність на рівні 80% до В/Phuket/3073/2013, який став новим вакцинним штамом і був включеним до складу вакцин на наступний епідемічний сезон 2015-2016 років. Українські ізоляти В/Odessa/393/2015, В/Kharkov/266/2015 та В/Ukraine/6449/2015 виокремились в окрему групу і селектували мутацію M251V.

Два ізоляти - В/Zaporizha/333/2015 та В/Ukraine/6368/2015 мали унікальне точкове заміщення T519S. Точкове заміщення A500T (аланін заміщувався на треонін) спостерігалось у українського ізоляту В/Odessa/390/2015, найбільш подібними до нього виявились ізоляти з Хорватії та Небраски (США).

Аналіз за генами нейрамінідази показав подібні результати з аналізом за генами гемаглютиніну, зокрема переважне розташування вірусів сезону 2014-2015 років у кластері В/Wisconsin/01/2010. Ізоляти минулого сезону були розміщені у межах двох кластерів В/Wisconsin/01/2010 і В/Massachusetts/02/2012.

Таким чином, сиквеновані ізоляти грипу сезону 2014-2015 років, виділені в Україні знаходились у кластері В/Wisconsin/01/2010- В/Phuket/3073/2013, хоча ізоляти з інших країн розташувались у межах обох генетичних кластерів, подібно минулому сезону. Що свідчить про циркуляцію вірусів обох генетичних кластерів

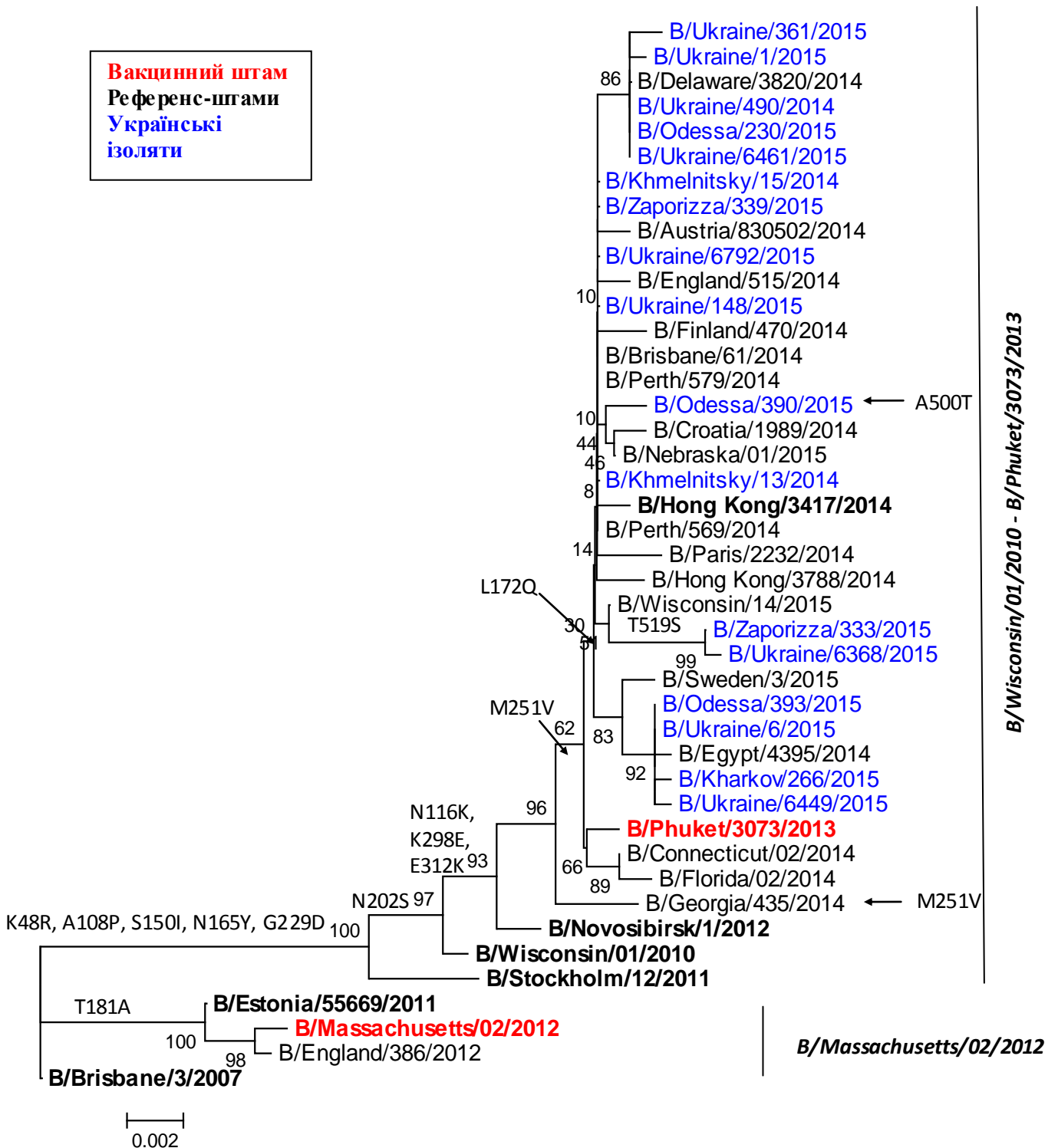


Рис. 5. Філогенетичне дерево вірусів грипу В/Yamagata сезону 2014-2015 за послідовностями генів гемаглютиніну (НА), проведений методом NJ модель Kimura 2-parameter з 1000 бутстреп реплікацій.

Таким чином, сиквеновані ізоляти грипу сезону 2014-2015 років, виділені в Україні знаходились у кластері B/Wisconsin/01/2010- B/Phuket/3073/2013, хоча ізоляти з інших країн розташувались у межах обох генетичних кластерів, подібно минулому сезону.

## Порівняльний аналіз мутацій (амінокислотних заміщень) в генах HA та NA вірусів грипу в сезоні 2012 – 2015 років

### Характеристика мутацій вірусів грипу типу A(H1N1)pdm09.

Значимість амінокислотних заміщень враховується з положенням їх в межах антигенно важливих сайтах або поза їми; втратою або набуттям потенційних сайтів глікозилювання; зміною фізико-хімічних властивостей амінокислот (зміна заряду амінокислотного залишку, зміна полярності). Відомі мутації, котрі зустрічаються в антигенних сайтах, зменшують або інгібують зв'язування нейтралізуючих антитіл, дозволяючи тим самим новому підтипу вірусу широко розповсюдитися серед неімунного прошарку населення. Набуття чи втрата потенційних сайтів глікозилювання впливає на розпізнавання вірусу імунною системою організму людини. Приєднання додаткових сахарів служить як потенційний захист вірусу для уникнення імунного нагляду.

Віруси грипу A(H1N1)pdm09 поширені по всьому світу, та за геном HA відносяться до генетичної групи 6, яка поділяється на A, B, C. Українські ізоляти за характерними мутаціями відносять до генетичної групи 6B.

Більшість мутацій, таких як D97N, P83S, S203T і т.д. виникли у 2009 році та закріпилися у вірусів і спостерігались протягом наступних досліджуваних сезонів, як видно з таблиці (табл. 2).

Таблиця 2.

Амінокислотні заміни в послідовностях гену HA та NA вірусів грипу A(H1N1)pdm09

Ген	HA			NA		
	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2012-2013	2013-2014	2014-2015
Заміни	P83S, S203T, I321V	P83S, S203T, I321V	P83S, S203T, I321V	V106I, N248D	V106I, N248D	V106I, N248D
	S185T, S451N	S185T, S451N	S185T, S451N	V241I, N369K, N44S, I106V, N200S	V241I, N369K, N44S, I106V, N200S	V241I, N369K, N44S, I106V, N200S
	D97N	D97N	D97N	–	I34V, I321V, K432E	I34V, I321V, K432E
				N386S	N386K	N386K
	K283E, E499K	K283E, E499K	K283E, E499K	–	–	I117M, I365T
	–	K163Q, A256T	K163Q, A256T	–	–	I396M
	A256T					
Унікальні заміни в українських ізолятах	K22R, L44I, K146N, S183P, K160N	T474M, I510V	S84N, D94N, R205K	V83A, R220K, D416N	–	P93H, P198S, H275Y

Група вірусів, що мали мутації K283E, E499K набули найбільш широкого поширення у світі. Амінокислотні заміни, характерні для цієї групи, розміщені поза відомими антигенними сайтами та далеко від рецептор-зв'язуючого сайту.

Заміщення A256T у сезоні 2012-2013 років спостерігалась лише у одного українського ізоляту, але у сезоні 2014-2015 років була виявлена у всіх українських вірусів.

Мутація K163Q, яка виявлялась в ізолятах по всьому світу, в українських виникла лише у сезоні 2013-2014 років та спостерігалась у наступних роках. Точкові мутації у гені гемаглютиніні українських ізолятів, такі як L44I, T474M, D94N виявлялись кожного сезону.

Усі ізоляти вірусів грипу A(H1N1)pdm09 починаючи з 2009 року несуть дві основні мутації в гені нейрамінідази – V106I та N248D, які у всіх випадках зустрічаються з заміною S203T в HA. Ці заміни знаходяться в областях, які не пов'язані безпосередньо з каталітичними властивостями фермента чи з антигенними сайтами, проте вони спостерігаються у всіх ізолятах вірусів досліджуваних сезонів.

У сезоні 2014-2015 в українського ізоляту A/Ukraine/292/2015 була виявлена мутація H275Y, яка зумовлює стійкість до озельтамівіру.

**Характеристика мутацій вірусів грипу типу A(H3N2).** Філогенетичні дерева гену HA для вірусів грипу A(H3N2) можна поділити на 7 генетичних груп базуючись на змінах амінокислот, проте, лише циркулюють віруси 3-ої генетичної групи. Починаючи з 2013 року, субгрупа 3C є найбільш поширеною по всьому світу. Для таких вірусів характерне заміщення S45N, що призвело до набуття потенційного сайту глікозилування (табл. 3). Усі досліджувані ізоляти, як з України, так і з інших країн мали ряд спільних амінокислотних замін, характерних для кластеру A/Victoria/208/2010, таких як K62E, T212A та S214I. Також, починаючи з сезону 2013-2014 років в українських ізолятів виникла і закріпилась в наступному сезоні заміни K144N та L183H. Група мутацій, які спостерігались протягом всіх трьох сезонів - Q33R, N278K, N145S призвели до набуття потенційних сайтів глікозилування.

Також слід відмітити, що з 2013-2014 років виникла нова мутація R142G, яка спостерігалась у деяких українських ізолятів двох сезонів і зумовлювала зміну заряду амінокислотного залишку (табл. 3). Серед ізолятів всіх досліджуваних сезонів спостерігалась наявність подвійної заміни S367N та K369T, яка привела до набуття нового сайту глікозилування в залишку 367. Інші сайти глікозилування втрачались в залишку 402 (N402D).

У сезоні 2013-2014 років також були наявні мутації – Y155F, D251V, S315G та I312T, які не закріпились в ізолятів наступного сезону.

Амінокислотні заміни в послідовностях гену HA та NA вірусів грипу А(Н3N2)

Ген	HA			NA		
	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2012-2013	2013-2014	2014-2015
Заміни	K62E, – – T212A, S214I	K62E, K144N, L183H, T212A, S214I	K62E, K144N, L183H, T212A, S214I	S367N, K369T, I464L L81P, N402D	S367N, K369T – L81P, N402D	S367N, K369T, I464L L81P, N402D
	S45N, T48I	S45N, T48I	S45N, T48I	D93G	D93G	D93G
	Q33R, N278K, N145S	Q33R, N278K, N145S	Q33R, N278K, N145S	E221D, T238A, S416N I62V	E221D – – –	– – – –
	–	R142G	R142G	–	–	–
	–	L157S	L157S	–	V412I, I392T	– I392T
	D489N	D489N	D489N	–	–	–
	–	A530V	–	–	Y155F, D251V, S315G	– – –
	–	I214T	–	–	–	–
	–	N122D, V529I	–	–	I312T	–
	–	L3I	L3I, N144S, F159Y	–	–	T267K, I380V
	–	–	–	–	–	M51V
	–	–	–	–	–	–
	Унікальні заміни в українських ізолятів	–	K27R, A128V, I140M, V402I	Q75H, N171K, R261Q	N86D	Q5K, S44P, P45S, P99A, T434I

Точкові мутації виникли і у сезоні 2014-2015 років, які не були раніше відмічені в українських ізолятів, а саме - T267K, I380V та M51V.

**Характеристика мутацій вірусів грипу типу В/Yamagata.** Українські ізоляти в сезоні 2012-2013 років належали до 2 кластерів – В/Wisconsin/01 та В/Massachusetts/02. Починаючи з 2013-2014 років циркуляція вірусів, що належать до кластеру /Massachusetts/02 на території України не спостерігалась. Впродовж сезонів 2013-2014 та 2014-2015 років циркулювали лише віруси, що належать до кластеру В/Wisconsin/01. У послідовностях гемаглютиніна була знайдена мутація D196N, яка була пов'язана з набуттям потенційного сайту глікозилування. Дана мутація спостерігалась протягом усіх досліджуваних сезонів.

Так, в сезоні 2012-2013 років ще спостерігалась циркуляція ізолятів, які належали до кластеру В/Massachusetts/02, вони мали специфічні для цієї групи вірусів мутації. Також, цього сезону циркулювали віруси, що належали до кластеру В/Wisconsin/01. Вони мали спільні заміни – S150I, N165Y. У послідовностях генів нейрамінідази були виявлені амінокислотні заміни, характерні для кластеру

B/Massachusetts/02 – I248E, T106I, S295R, так як спостерігалась його циркуляція в 2012-2013 років.

Протягом трьох досліджувальних сезонів циркулювали віруси грипу кластеру B/Wisconsin/01, вони мали ряд спільних мутацій, таких як Q42R, A68T, T125K, D463N (табл.4).

Таблиця 4.

Амінокислотні заміни в послідовностях гену HA та NA вірусів грипу B/Yamagata

Ген	HA			NA		
	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2012-2013	2013-2014	2014-2015
Заміни	K88R, D196N	K88R, D196N	K88R, D196N	I248E, T106I, S295R	–	–
	R48K, P108A, T181A	–	–	Q42R, A68T, T125K, D463N	Q42R, A68T, T125K, D463N	Q42R, A68T, T125K, D463N
	–	–	K48R, A108P, S150I, N165Y, G229D	–	I45V, I49T, S295R, E320D, K343E	I45V, I49T, S295R, E320K, K343E
	–	N202S, N116K	N202S, N116K	–	–	D384G
	–	–	–	–	–	–
	K298E, E312K	K298E, E312K	K298E, E312K	V422I	–	–
	–	M251V	M251V	–	–	–
	–	–	L172Q	–	–	–
Унікальні заміни в українських ізолятах	T75N, N116K, D163N, N164S, M251L	–	A500T	C54Y, A68E, P67S, I262M, I396E	–	L74P, T81M, E308K, M403I, M429I

Отже, кожного сезону в результаті сиквенування як генів гемаглютиніну, так і генів нейрамінідази, спостерігалось виникнення великої кількості унікальних амінокислотних замін, які не впливали на антигенну чи на інші функціональні ділянки. Частина цих мутацій виникала, зокрема, як наслідок культивування на культурі клітин, а багато з них так і залишаються не розшифрованими.

В результаті дослідження мутацій, які зумовлюють виникнення стійкості до противірусних препаратів, таких як озельтамівір, було виявлено лише у одного українського ізоляту 2015 року протягом усього періоду нашого спостереження.

## ВИСНОВКИ

В дисертації була вирішена науково-практична задача - досліджена мінливість вірусів грипу за антигенними та генетичними характеристиками із застосуванням філогенетичного аналізу для оцінки гетерогенності їх популяції (з 2012 по 2015 роки), що дозволяє проводити якісне етіологічне прогнозування епідемій грипу в

Україні, яке сприяє вчасному прийняттю управлінських та організаційних рішень. Основні результати представлені у висновках:

1. Протягом епідемічних сезонів грипу 2012-2015 років зареєстрована одночасна циркуляція генетичних варіантів трьох збудників грипу – А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) та В генетичної гілки В/Yamagata у різному відсотковому співвідношенні. Так, вірус грипу А(Н1N1)pdm09 грав ключову роль в епідемічному процесі 2012-2013 років, де його відсоткова частка становила  $(45,6 \pm 3,3)$  %. В сезоні 2013-2014 років вірус грипу А(Н3N2) домінував та склав  $(73,3 \pm 3,4)$  %. Віруси грипу В переважали у 2014-2015 роках, їх відсоткова частка становила  $(64,2 \pm 2,9)$  %. Таким чином, щосезону відбувалась зміна провідного збудника епідемії.

2. Встановлено, що українські ізоляти (Н1N1)pdm09 протягом всіх трьох сезонів зберегли антигенну спорідненість з референс-штамом А/California/07/2009 та залишались антигенно однорідними, що говорить про їх низьку антигенну мінливість.

3. Для вірусів грипу А(Н3N2) спостерігалась висока антигенна мінливість. Протягом трьох сезонів вони належали до різних референс-штамів: А/Victoria/361/2011 (2012-2013 роках), А/Texas/50/2012 (2013-2014 роках) та А/Switzerland/9715293/2013 (2014-2015 роках). Лише частина вірусів в сезоні 2012-2013 років за послідовностями нейрамінідази належали до субкластеру 3А, тоді як за гемаглютиніном — до 3С. Надалі циркуляції вірусів, які належать до субкластеру 3А, на території України не спостерігалось.

4. Всі досліджувані ізоляти сезону 2014-2015 років розташувались у субкластері 3С кластеру А/Victoria/208/2009, а за набутими новими амінокислотними замінами в гемаглютиніні були розподілені на три групи: 3С.2а, 3С.3а, 3С.3б. Більшість ізолятів, виділених в Україні, належали до групи 3С.2а, яка характеризується нездатністю аглютинувати еритроцити, що викликає складності при вивченні їх антигенних властивостей.

5. Показано, що віруси грипу типу В генетичної гілки В/Yamagata кожного року змінювались, що дозволяло віднести їх до різних референс-штамів. В 2012-2013 роках спостерігалась їх найбільша антигенна спорідненість до штаму В/Wisconsin/01/2010, в 2013-2014 роках до В/Massachusetts/02/2012, а в сезоні 2014-2015 років - В/Phuket/3073/2013, що свідчить про постійну зміну їх антигенних властивостей.

6. В результаті аналізу амінокислотних заміщень у послідовностях НА були виявлені нові заміщення А256Т, К163Q та закріплення їх у популяції у вірусів А(Н1N1)pdm09, що свідчить про поширення вірусів групи 6В. Для вірусів грипу А(Н3N2) була характерна поява заміщень, які призвели до набуття потенційних сайтів глікозилування (Q33R, N278K, N145S) та могли надати вірусам більшого захисту від імунної відповіді організму людини. З 2013-2014 років у ізолятів А(Н3N2) виникло нове заміщення R142G, яке спостерігалось у деяких українських ізолятів двох сезонів і зумовлювало зміну заряду амінокислотного залишку, що могло вплинути на зміну антигенних властивостей. В сезоні 2012-2013 років віруси грипу В належали до генетичних кластерів В/Massachusetts/02 з заміщеннями (R48K,

P108A, T181A) та В/Wisconsin/01, а у двох наступних сезонах - тільки до В/Wisconsin/01 з заміщеннями (K88R, D196N).

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Phylogenetic analysis of influenza A viruses (H1N1)pdm circulating during 2014-2015 epidemic season in Ukraine / L.V.Radchenko O.Yu. Smutko, A.Yu.Fesenko, A.P. Mironenko // *Biopolymers and Cell*. – 2016. – Vol. 32. N 5. – P. 377-380. *(Дисертант провела філогенетичний аналіз циркулюючих вірусів грипу).*
2. Comparative analysis of mutations in influenza viruses genes – HA and NA, isolated during 2012-2015 years / L. Radchenko, O. Smutko, A.Fesenko, A. Mironenko // *Вісник КНУ ім. Т. Шевченка, серія «Проблеми регуляції фізіологічних функцій»*. – 2016. - №1(20). - С. 57- 61. *(Дисертант брала участь в експериментальній частині, аналізуванні наявних мутацій та в опрацюванні літературних даних за темою статті).*
3. Адаптивні властивості виділених в Україні вірусів грипу в умовах обмеженого використання противірусних препаратів. / С.Бабій, Л.Радченко, А.Фесенко та ін. // *Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна, серія «Біологія»*. – 2015. – № 1153 (24). – С.18-24. *(Дисертант брала участь у експериментальних дослідженнях на тему статті та опрацьовувала літературні дані).*
4. Вирусологический надзор за гриппом и другими ОРВИ в Житомирской области / Бояльська О.Г., Киричук И.М., Мироненко А.П., Радченко Л.В. // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2015. – Т.3(120) №2 – С.95-100. *(Дисертантом опрацьована література, яка використовувалася для написання статті).*
5. Визначення противірусної дії низькоінтенсивного лазерного опромінення на моделі чутливих клітин та вірусу грипу / Березіна Л.В., Фільчаков І.В. Міроненко А.П., Войцехович В.С., Холін В.В., Радченко Л.В. // *Журнал «Фотобіологія та фотомедицина»*. – 2014. –№ 1,2 – С. 59-63. *(Дисертант брала участь в експериментальній частині роботи, проводила аналіз ізоляції вірусів грипу на культурі клітин).*
6. Phylogenetic analysis of B/Victoria – like influenza viruses isolated in 2008 – 2012 in Ukraine / L.Leibenko, S.Babii, L.Radchenko, O.Smutko // *Вісник КНУ ім.Т.Шевченка, серія «Біологія»*. – 2013. – №3(65). – С. 37-42. *(Дисертант проводила дослідження вірусів грипу методом ПЛР та ізоляції їх на чутливій культурі клітин).*
7. Phylogenetic analysis of influenza A viruese (H3N2) circulating in Zhytomyr region during 2013-2014 epidemic season / O.G. Boyalska, I.M. Kyrychuk, I. G. Budzanivska, A.P. Mironenko, L.V. Radchenko, O.Yu. Smutko // *Biopolymers and Cell*. – 2015. – Vol. 31. N 3. – P. 226-232. *(Дисертант брала участь в обговоренні отриманих результатів роботи).*
8. Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of influenza A(H3N2) viruses isolated in Ukraine in 2013 – 2014 season / S.V. Babii , L.V. Leibenko , A.Yu. Fesenko , L.V. Radchenko, O.Yu. Smutko, O. Boyalska, A.P. Mironenko // *Журнал*

- «Мікробіологія та біотехнологія». – 2015. – №2(30). – С. 20-26. *(Дисертантом особисто побудовані філогенетичні дерева та проведено узагальнення результатів роботи, висновки зроблено колективно).*
9. Філогенетичний аналіз вірусів грипу людей А(Н3N2), виділених в Україні в епідемічному сезоні 2011-2012 років / Лейбенко Л.В., Поліщук В.П., Радченко Л.В. та ін. // Журнал «Мікробіологія і біотехнологія». – 2013. – №1(21). – С. 37-47. *(Дисертант брала участь у експериментальній частині та в опрацюванні результатів роботи, оформленні матеріалів для публікації).*
  10. Cerium dioxide nanoparticles increase immunogenicity of the influenza vaccine. / Nadezhda M. Zholobak, Alla P. Mironenko, Alexander B. Shcherbakov, Olga A. Shydlovska, Mykola Ya.Spivak, Larysa V. Radchenko at al. // Antiviral Research. – 2016. - №127. – P. 1-9. *(Дисертантом було проведено РІГА, інтерпретація результатів, висновки зроблено колективно).*
  11. Epidemiological and virological characteristics of influenza B: results of the Global Influenza B Study / Caini S., Huang Q.S., Ciblak M., Kuszniarz G. et al. in appendix 1: Radchenko L. //Influenza and other Respiratory Viruses. – 2015. – P. 3-12. *(Дисертантом опрацьовані дані щодо циркуляції вірусів грипу типу В різних генетичних гілок в Україні з 2000-2013 роки).*
  12. Генетичне різноманіття вірусів грипу гілки В/VICTORIA, виділених в Україні у 2008-2012 роках /Лейбенко Л.В., Онищенко О.В., Голубка О.С., Радченко Л.В. та ін. // Тези на XIII з'їзд ТМУ ім.С.М. Виноградського. – 2013. – С.458. *(Дисертантом виконано збір зразків вірусомісного матеріалу, проведено аналіз отриманих даних та оформлення матеріалів для публікації).*
  13. Антигенний та генетичний аналіз вірусів грипу, виділених на початку сезону 2014 – 2015 років /Радченко Л.В., Лейбенко Л.В., Смутько О.Ю. та ін. // В рамках VI Міжнародний медичний конгрес. «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України». – 2015. – С.128.*(Дисертантом зроблені філогенетичні дерева, проведено статистичний аналіз отриманих результатів та оформлення матеріалів для публікації).*
  14. Influenza sentinel surveillance in Ukraine and characteristics of isolates during the season 2012 – 2013. /A. Mironenko, O.Onyshchenko, O. Holubka, L.Leibenko, L. Radchenko at al. //Abstracts, Options for the control of influenza, Cape Town, 5-10 September. – 2013. – P. 638. *(Дисертантом виконано збір зразків вірусомісного матеріалу та проведено аналіз отриманих результатів).*
  15. Філогенетический анализ вирусов гриппа людей типа А сезона 2012-2013гг. в Украине /Лейбенко Л.В., Голубка О.С., Онищенко О.В., Радченко Л.В. и др. // Молекулярная диагностика 2014. Сборник трудов VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Том 1, Москва. – 2014. – С.348-349. *(Дисертантом зроблені філогенетичні дерева, проведено аналіз отриманих результатів та оформлення матеріалів для публікації).*
  16. Дозорний епіднадгляд за грипом в Україні та характеристики ізолятів сезону 2012-2013рр. /А.П. Міроненко, О.В. Онищенко, О.С. Голубка, Л.В. Лейбенко. Л.В. Радченко та ін. //Науково – практична конференція «Інфекційні хвороби : невирішені проблеми (діагностика, етіопатогенетичні особливості, лікування,

- профілактика)». – 2013. – С. 69-70. *(Дисертантом проаналізовані літературні джерела та зроблено статистичний аналіз отриманих даних).*
17. Detecting respiratory viral pathogens isolated in pre-epidemic influenza season in Ukraine /Leibenko L., Radchenko L., Onischenko O. at al. //Abstract book 4<sup>th</sup> International Influenza Meeting. Muenster, September 21-23. – 2014. – P.106. *(Дисертантом проаналізовані літературні джерела, зроблена інтерпретація отриманих даних, подача тезисів до друку).*
18. Phylogenetic analysis of A(H3N2) influenza viruses circulating in Ukraine during 2008-2012 years. /A. Mironenko, L. Leibenko, O. Onyshchenko, O. Holubka, S. Babii, L. Radchenko // Options VIII for the Control of influenza, Cape Town, South Africa. – 2013. – P.174. *(Дисертантом виконано збір зразків вірусомісного матеріалу та проведено аналіз отриманих даних).*
19. Phylogenetic analysis of influenza B viruses circulating in Zhytomyr region during 2010-2011 and 2014-2015 epidemic seasons./O.G. Boyalska, O.V.Onyschenko, L.V. Radchenko, O.Yu. Smutko //Матеріали Міжнародної конференції для молодих учених «СУС-2015», Київ, 21-25 вересня 2015.- С. 57.*(Дисертантом виявлені амінокислотні заміщення в досліджувальних ізолятах та проведено аналіз отриманих результатів).*
20. Influenza SARI sentinel surveillance in Ukraine and characteristics of season 2015-2016 /Alla Mironenko, Olha Holubka, Larysa Radchenko at al. // IX options for the control of influenza. Chicago, August - 24-28, 2016. – P. – 193. *(Дисертантом виконано збір зразків вірусомісного матеріалу та проведено аналіз отриманих результатів).*

## АНОТАЦІЯ

**Радченко Л.В. Антигенна та генетична характеристика вірусів грипу людей в Україні у 2012-2015 роках.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

Дисертація присвячена аналізу мінливості вірусів грипу людей, виділених в Україні з 2012 по 2015 роки за антигенними і генетичними характеристиками та на основі філогенетичного порівняння. У роботі подана детальна етіологічна структура вірусів грипу протягом досліджуваних сезонів та порівняно її з етіологічною структурою європейських країн та світу. Виявлено відмінності за домінуючим збудником в Україні, порівняно з іншими країнами. На основі аналізу амінокислотних послідовностей генів HA та NA вірусів грипу 2012-2015 років, виявлені унікальні амінокислотні заміщення, притаманні лише вірусам грипу, що циркулювали в Україні, та виявлені мутації, які відрізняли ці віруси від таких, що циркулювали в світі. Зроблений посезонний порівняльний аналіз амінокислотних заміщень вірусів грипу людей типу А: А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) та типу В генетичної гілки – В/Yamagata, що циркулювали в Україні та інших країнах в цей час, що дозволило виявити різноманіття циркулюючих збудників грипу, які належали до різних генетичних кластерів протягом періоду спостереження.

Отримані дані при виконанні роботи дозволили дослідити мінливість вірусів грипу за антигенними та генетичними характеристиками, їх гетерогенність, що дає змогу в майбутньому поліпшити етіологічне прогнозування наступних епідемій грипу та домінуючих збудників в країні.

**Ключові слова:** віруси грипу, антигенна характеристика, філогенетичний аналіз, амінокислотні заміщення, мутації.

## АННОТАЦІЯ

**Радченко Л.В. Антигенная и генетическая характеристика вирусов гриппа людей в Украине в 2012-2015 годах.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06 – вирусология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2017.

В диссертации представлены результаты изучения изменчивости вирусов гриппа людей, выделенных в Украине в период с 2012 по 2015 года по антигенным и генетическим характеристикам. В работе приведена детальная этиологическая структура популяции вирусов гриппа на протяжении исследуемых сезонов и дано ее сравнение с таковой в европейских странах и в мире. Показаны результаты изучения антигенных свойств вирусов гриппа людей, определена степень их родства к референс- и вакцинным штаммам. Методом объединения ближайших соседей (NJ) построены уникальные филогенетические деревья, которые продемонстрировали генетическое подобие украинских изолятов к таким из других стран. В результате анализа аминокислотных последовательностей генов HA и NA вирусов гриппа 2012-2015 годов обнаружены уникальные аминокислотные замены, присущие вирусам гриппа, которые циркулировали лишь в Украине. Проведенный ежесезонный сравнительный анализ аминокислотных замен в вирусах гриппа людей типа А: А(Н1N1)pdm, А(Н3N2) и типа В генетической линии – В/Yamagata, изолированных в Украине и других странах, что позволило обнаружить разнообразие циркулирующих возбудителей гриппа, и принадлежность их к разным генетическим кластерам на протяжении всего периода наблюдения.

Результаты антигенной характеристики вирусов гриппа А(Н1N1)pdm09 в трех исследуемых сезонах продемонстрировали их подобие к разным референс-штаммам, но при этом сохранили высокое генетическое сходство к вакцинному штамму А/California/7/2009, что свидетельствует об их антигенной однородности. По характерным мутациям украинские изоляты относятся к генетической группе 6В, только у одного изолята в последовательности нейраминидазы была обнаружена мутация Н275У, свидетельствующая об резистентности к озельтамивиру. Вирусы гриппа А(Н3N2) иллюстрировали гетерогенность свойств гемагглютинаина циркулирующих изолятов, в следствии чего менялось родство к разным штаммоспецифическим сывороткам и состав вакцин менялся каждый сезон. Филогенетический анализ продемонстрировал, что в Украине, как и в мире наиболее распространены вирусы генетической субгруппы 3С, с характерным замещением S45N (дополнительный сайт гликозилирования).

Все изоляты вирусов гриппа типа В в исследуемых сезонах относились к генетической ветке В/Yamagata. В сезоне 2012-2013 годов вирусы гриппа разделились на два генетических кластера: В/Wisconsin/01/2010 и В/Massachusetts/02/2012 в зависимости от специфических замен. В сезоне 2012-2013 годов вирусы гриппа В принадлежали к генетическому кластеру В/Massachusetts/02/2012 с замещениями (R48K, P108A, T181A) и кластеру В/Wisconsin/01/2010, а в двух следующих сезонах (2013-2014 и 2014-2015 г.г.) – только к кластеру В/Wisconsin/01/2010 с замещениями (K88R, D196N).

Полученные данные при выполнении работы позволили исследовать изменчивость вирусов гриппа по антигенным и генетическим характеристиками, их гетерогенность, что делает возможным в будущем улучшить этиологическое прогнозирование будущих эпидемий гриппа и доминирующего возбудителя в стране.

**Ключевые слова:** вирусы гриппа, антигенная характеристика, филогенетический анализ, аминокислотные замены, мутации.

## SUMMARY

**Radchenko L.V. The antigenic and genetic characteristics of human influenza viruses in Ukraine in 2012-2015 years.** – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences, specialty 03.00.06 - virology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

Thesis devoted to the variability of human influenza viruses isolated in Ukraine from 2012 to 2015 years for the antigenic and genetic characteristics and based on phylogenetic comparison. The paper contains a detailed etiologic structure of influenza viruses population during investigated seasons and compared with etiological structure of the European countries and in the world.

Based on the analysis of amino acid sequences of genes HA and NA influenza viruses in 2012-2015 years were observed the amino acid substitutions unique to influenza viruses which circulated in Ukraine. Author also identified mutations that were different from viruses that have been circulating in the world. As a result of this analysis has been allowed to detect the diversity of circulating influenza viruses belonging to different genetic clusters during the observation period.

The findings of this work – were investigated the variability of influenza viruses for antigenic and genetic characteristics, their heterogeneity, allowing in the future to improve the etiological prediction of the next influenza epidemics and dominant agent in the country.

**Key words:** influenza viruses, antigenic characteristics, phylogenetic analysis, amino acid substitutions, mutations.